



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 5/10</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 97/44443</b> <b>(43) Date de publication internationale:</b> 27 novembre 1997 (27.11.97)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR97/00897 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 22 mai 1997 (22.05.97)  <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 96/06630                      23 mai 1996 (23.05.96)                      FR  <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> MERIAL [FR/FR]; 17, rue Bourgelat, F-69002 Lyon (FR).  <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> BOUQUET, Jean-François [FR/FR]; 40, chemin de l'Hôpital, F-69280 Sainte Consorce (FR). CLEUZIAT, Catherine [FR/FR]; 16, rue de l'Espérance, F-69003 Lyon (FR). SAMARUT, Jacques [FR/FR]; 169 bis, route de Genas, F-69100 Villeurbanne (FR). DESMETTRE, Philippe [FR/FR]; Le Treuil, 35, chemin de la Vernique, F-69130 Ecully (FR).  <b>(74) Mandataire:</b> COLOMBET, Alain; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AU, CA, JP, NZ, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i> <i>Avec une indication relative à un micro-organisme déposé, fournie selon la règle 13 bis, séparément, et non pas avec la description.</i> <i>Date de réception par le bureau international:</i> 2 juillet 1997 (02.07.1997)
<b>(54) Title:</b> IMMORTAL AVIAN CELLS <b>(54) Titre:</b> CELLULES AVIAIRES IMMORTELLLES		
<div style="text-align: center;"> </div>		
<b>(57) Abstract</b> <p>The invention features apoptosis-resistant, non-transformant immortalised avian cells, in particular, avian tissues, i.e. other than blood or haematopoietic cells, particularly fibroblasts and epithelial cells, for instance embryos.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>La présente invention a pour objet des cellules aviaires immortalisées non transformées, résistantes à l'apoptose, en particulier provenant de tissus aviaires, c'est-à-dire autres que des cellules sanguines ou hématopoïétiques, notamment fibroblastes et cellules épithéliales, par exemple d'embryons.</p>		

### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

5

10

## CELLULES AVIAIRES IMMORTELLLES

La présente invention est relative à des lignées de cellules aviaires et leurs dérivés.

15 L'établissement de lignées cellulaires à partir d'organes prélevés sur les espèces aviaires ne peut être obtenu spontanément, comme c'est le cas avec certains organes provenant d'espèces mammifères.

Les seules lignées cellulaires disponibles jusqu'à maintenant ont été obtenues en utilisant les propriétés transformantes de certains virus aviaires ayant des propriétés oncogènes, tels que les rétrovirus du groupe leucoses aviaires ou le virus de la maladie de Marek, ou de certaines molécules chimiques telles que la méthylcholanthrène et la diéthyl-nitrosamine.

20 Ces lignées cellulaires présentent, pour la plupart, un caractère de transformation important qui les rend impropres à la multiplication de virus vaccinaux.

Des auteurs se sont engagés sur une nouvelle voie consistant à introduire dans les cellules un vecteur ne présentant pas de caractère oncogène mais capable d'intégrer dans ces cellules un gène choisi pour sa capacité à induire l'immortalisation.

Les premiers essais ont été réalisés à l'aide de vecteurs intégrant des gènes de rétrovirus aviaires tels que erbA, erbB.

30 La demande de brevet français FR-A-2 596 770 propose un procédé d'immortalisation dans lequel on infecte une culture de cellules aviaires ou de mammifères avec un vecteur ou un système ne présentant

pas de caractère oncogène pour lesdites cellules mais capable d'intégrer dans ces cellules un gène choisi parmi v-myb, v-ets et v-erbA. Des vecteurs appropriés peuvent être les virus AMV, E26 et XJ12, ce dernier étant un virus dérivé du virus AEV dans lequel le gène v-erB, oncogène, a été supprimé.

5 Dans la pratique, ces essais ont permis d'obtenir des lignées cellulaires établies à partir de cellules de la lignée hématopoïétique, mais n'ont pas donné les résultats escomptés pour les cellules d'embryon de poulet en culture adhérente telles que les fibroblastes ou les cellules épithéliales.

10 Des lignées de cellules aviaires de type myéloblastoïde (cellules sanguines) non transformées ont pu être obtenues à l'aide de l'oncogène myb (demande de brevet internationale WO91/18971).

15 Parallèlement, des auteurs ont proposé les gènes précoces t et T du virus simien SV40 pour immortaliser des cellules provenant de différents tissus de mammifères (D.S. Neufeld et al., Molecular and Cellular Biology, août 1987, 2794-2802, O. Kellermann et F. Kelly, Differentiation 1986, 32 : 74-81 et demande de brevet français FR-A-2 649 721).

20 La demande de brevet français FR-A-2 649 721 propose de son côté une méthode d'immortalisation conditionnelle qui serait utilisable pour tous les types cellulaires et dans toutes les espèces, l'objectif étant ici de remédier à l'inconvénient de la grande spécificité des voies classiques (limitation à des espèces et/ou à des types cellulaires particuliers) : transformation des cellules par un virus transformant (adénovirus, virus d'Epstein-Barr, certains papovavirus tels que le virus SV40 ou le virus du polyome ; par exemple, le virus SV40 est indiqué comme ne transformant que les cellules de rongeurs et les cellules humaines) ; transfection avec des constructions contenant un gène transformant lié à un promoteur viral ; transfection avec un gène transformant lié à un promoteur cellulaire. Le choix de cette demande de brevet se porte sur une construction associant un fragment d'ADN de la séquence régulatrice de la vimentine et un fragment d'ADN codant pour un gène immortalisant, qui peut être l'antigène T du virus SV40 sous le contrôle du promoteur, inductible, de la vimentine. Les espèces aviaires ne sont jamais mentionnées dans ce document.

30 Dans l'espèce aviaire, l'utilisation réelle de tels oncogènes viraux n'a jamais

été décrite excepté l'utilisation de la forme 12S de la protéine E1A de l'Adénovirus 5 humain qui a permis d'immortaliser des cellules épithélioïdes de caille (Guilhot et al. (1993), Oncogene 8 : 619-624).

Contre toute attente, les inventeurs ont réussi à produire des lignées cellulaires aviaires, immortelles et non transformées.

De manière plus générale, les inventeurs ont trouvé qu'il était possible de préparer des lignées cellulaires aviaires immortelles non transformées et résistantes à l'apoptose, même à partir de cellules de tissus aviaires, c'est-à-dire autres que les cellules circulantes du sang ou hématopoïétiques.

La présente invention a donc pour objet des cellules aviaires immortalisées non transformées, résistantes à l'apoptose, en particulier provenant de tissus aviaires, c'est-à-dire autres que des cellules sanguines ou hématopoïétiques, notamment fibroblastes et cellules épithéliales, par exemple d'embryons.

La présente invention a plus particulièrement pour objet une lignée cellulaire aviaire immortelle, non transformée, choisie parmi le groupe consistant en :

- lignée TDF-2A bcl-2 déposée à la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur) sous la référence I-1709
- lignée TCF-4.10 déposée à la CNCM sous la référence I-1710
- lignée TCF-4.10 bcl-2 déposée à la CNCM sous la référence I-1711

bcl-2 signifie que les cellules de la lignée intègrent de manière fonctionnelle le gène bcl-2 qui leur confère une résistance à l'apoptose (WO-A-93/20200 incorporée ici par référence).

Bien entendu, l'invention couvre les cellules issues de ces lignées. Par cela, il faut comprendre que sont couvertes non seulement les cellules telles que déposées à la CNCM sous les références indiquées, mais aussi les cellules constituant la descendance des précédentes, d'une part celles obtenues par simple multiplication et pouvant subir des mutations lors des multiplications et d'autre part celles obtenues après modification volontaire, ce qu'on appelle alors les cellules dérivées, et bien sûr celles ayant subi les deux types de modifications.

L'invention couvre donc aussi les cellules dérivées obtenues par modifications des cellules ci-dessus. Ces modifications peuvent comprendre :

- Insertion d'une ou plusieurs cassettes d'expression comprenant chacune une ou

plusieurs séquences nucléotidiques codant pour une molécule d'intérêt industriel, ces cassettes d'expression étant aptes à produire cette molécule après insertion dans les cellules de l'invention. La technique est parfaitement connue de l'homme du métier. Comme molécules d'intérêt industriel, on peut citer notamment des sous-unités virales de type peptide, protéine, glycoprotéine, notamment à usage de vaccin ou de réactif de diagnostic, des molécules protéiques telles que des hormones, etc.

- Infection chronique par un virus apte à se multiplier dans ces cellules, à des fins de production virale ou de vaccin, avec ou sans modification préalable de la sensibilité vis-à-vis de ce virus. L'infection peut aussi ne pas être chronique mais réalisée sur un lot de cellules choisi pour la multiplication virale.

(Les modifications qui suivent s'entendent de préférence avantageusement combinées aux deux types précédents).

- Introduction de gènes de survie ou anti-apoptose autres que bcl-2 tels que les gènes codant pour les protéines p19E1B de l'adénovirus humain (Rao et al. (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 7742-7746), LMP-1 (Gregory et al. (1991), Nature 349 : 612-614) et BHRF1 (Pearson et al. (1987), Virology 160 : 151-161) du virus Epstein Barr, ICP34.5 du virus herpes simplex (Chou et Roizman (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 3266-3270) et p35 du baculovirus (Clem et al. (1991), Science 254 : 1388-1390), afin de rendre ces lignées plus résistantes aux conditions de culture, notamment maintien à confluence.

- Surexpression de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire par des vecteurs appropriés pour augmenter la vitesse de prolifération. En effet, il a été montré que, dans certains cas, la surexpression de gènes codant pour des cyclines entraînait un raccourcissement du cycle cellulaire et donc une augmentation de la vitesse de prolifération (Rosenberg et al. (1995), Oncogene 10 : 1501-1509 ; Quelle et al. (1993), Genes and Dev. 7 : 1559-1571).

- Modification du spectre de sensibilité virale des lignées par intégration de gènes codant pour des récepteurs de virus d'intérêt, en vue de leur multiplication.

On peut se référer à l'espèce mammifère où l'expression du récepteur du virus de la rougeole (CD46) par des cellules murines, normalement non permissives au virus, entraîne une sensibilité de ces cellules à ce virus et la capacité à le répliquer (Naniche et al. (1993), J. Virol. 67 : 6025-6032). L'intérêt est notamment de rendre

les cellules sensibles à un virus afin de le produire sur celles-ci.

- Intégration d'oncogènes aptes à accélérer la croissance cellulaire.

Il va de soi que les cellules dérivées selon l'invention peuvent comprendre une ou plusieurs des modifications présentées ci-dessus.

5 L'invention a encore pour objet un procédé de production de molécules d'intérêt industriel ou de virus, comprenant la culture des cellules décrites ci-dessus.

Dans le cadre de la présente invention, on s'oriente notamment vers la production de molécules ou de virus pour la réalisation de réactifs de diagnostic ou de vaccins, ou encore de molécules d'intérêt thérapeutique.

10 L'invention va être maintenant décrite plus en détail à l'aide de modes de réalisation pris à titre d'exemples non limitatifs et se référant au dessin annexé, dans lequel :

- la figure 1 montre la structure du vecteur pDAMT servant à préparer la lignée TDF-2A, avec :

15 LTR : séquence répétée directe (Long Terminal Repeat)

LTR : LTR délétée

MTI : promoteur Metallothionéine I murin

SV40 T+t : région précoce SV40

SV40 : promoteur SV40

20 - la figure 2 montre la structure du vecteur pphMT servant à préparer la lignée TCF-4.10, avec :

LTR : séquence répétée directe (Long Terminal Repeat)

phléo : gène de résistance à la phléomycine

SV40pA : polyASV40

25 MTI : promoteur Metallothionéine I murin

SV40 T+t : région précoce SV40

### **EXEMPLE 1 = Production de la lignée cellulaire TDF-2A**

30 **I. Description de son origine et de ses caractéristiques**

**1.1 Description du vecteur utilisé : vecteur pDAMT**

Il comporte la région précoce du virus SV40 (code pour les antigènes T et t)

(fragment HindIII/BamHI) (Fiers et al.(1978), Nature 273 : 113-120) sous le contrôle du promoteur métallothionéine I de souris (fragment EcoRI/BglII transformé en site HindIII) (Durnam et al.(1980), Proc. natl. Acad. Sci. USA 77 : 6511-6515 ; Brinster et al. (1982), Nature 296 : 39-42).

5 Le fragment EcoRI/EcoRI contenant cette unité transcriptionnelle provenant du vecteur pMTSVneo (Peden et al. (1989), Exp. Cell. Res. 185 : 60-72) a été inséré dans le site XbaI du vecteur pDA1 (Aubert et al. (1991), J. Cell. Biol. 113 : 497-506). Ce dernier dérive essentiellement du génome du virus associé au sarcome de Rous-2 (RAV-2) après modification de la LTR située en 3'. En effet, la région U3 de la LTR  
10 3' de RAV-2 a été délétée et liée aux régions R et U5 isolées de la LTR du virus associé au sarcome de Rous-1 (RAV-1). Il porte également une unité transcriptionnelle contenant le gène de résistance à la néomycine sous le contrôle du promoteur SV40 dérivant du vecteur pSV2neo (Southern et Berg (1982), J. Mol. Appl. Genet. 1 : 327-341). Voir figure 1.

## 15 1.2. Etablissement de la lignée et démonstration du caractère immortalisé.

Des cellules provenant d'embryons de canard de Barbarie de 14 jours ont été transfectés par le vecteur pDAMT par la méthode utilisant le diméthylsulfoxyde (DMSO) et décrite par Kawai et Nishizawa (1984), Mol. Cell. Biol. 4 : 1172-1174. Les  
20 cellules transfectées sont ensuite sélectionnées par application de généticine G418 (150 µg/ml) pendant 15 jours. Les clones résistants sont alors subcultivés régulièrement à raison de 1 à 2 passages par semaine. Après cette période de prolifération active de 3 mois, les cellules sont entrées dans une période de crise durant laquelle la plupart des cellules sont mortes. Après cette période qui a duré environ 2 mois, plusieurs clones ont repris une prolifération active suggérant leur  
25 immortalisation.

La lignée cellulaire TDF-2A est issue ainsi de 2 cultures.  
Elle a été étudiée de manière plus approfondie.

Les cellules TDF-2A ont atteint 200 passages soit environ 460 générations et ont été ainsi maintenues en culture pendant plus de 600 jours en continu.  
30 Comparativement, des cellules témoins, n'exprimant pas la région précoce du virus SV40 ne peuvent être maintenus en culture plus de 20 passages.



### 1.3. Caractéristiques de prolifération.

Les cellules immortalisées sont cultivées à 38°C, en flacon roulant, dans un milieu contenant du HAM F-10 10X à 6%, 199 HANKS 10X à 4%, Tryptose Broth Phosphate 2,95 % à 4%, Bicarbonate de sodium 5,6% à 2,5%, vitamine BME 100X à 0,1%, sérum de veau foetal à 3%, Kanamycine 5% à 1%, Vancomycine 0,5% à 1%.

Dans ces conditions, leur taux de doublement est de 1 par 24 heures.

### 1.4. Expression de l'antigène T.

Par immunofluorescence ou immunophosphatase indirectes en utilisant un anticorps spécifique de l'antigène T (Pab 101 : Santa Cruz Biotechnology ref. sc147), il a été vérifié que toutes les cellules expriment l'antigène T dans leur noyau, indiquant qu'elles ont toutes intégré le vecteur.

Cette intégration a d'ailleurs été montrée par Southern-blot. L'ADN génomique des fibroblastes immortalisés a été digéré par les enzymes de restriction XbaI, BstXI. L'hybridation avec une sonde spécifique de l'antigène T (fragment NdeI/NdeI de 1018 pb) a permis de vérifier que l'unité transcriptionnelle permettant l'expression du gène immortalisant, insérée dans les cellules TDF-2A, n'avait pas subi de remaniements majeurs. En effet, la taille des fragments d'hybridation obtenus est conforme à celle attendue.

### 1.5. Absence de pouvoir tumorigène.

Les cellules immortalisées ne présentent pas de pouvoir tumorigène. Elles sont incapables de former des colonies en milieu semi-solide ou de former des tumeurs sur membrane chorioallantoïdienne d'oeufs de poule ou de cane. Elles sont également incapables de former des tumeurs sur souris nue (souris "nude"), sur poussins et canetons SPF (exempts d'organismes pathogènes) de 1 jours.

### 1.6. Caryotype.

Le caryotype des cellules TDF-2A a été étudié aux 114ème et 135ème passages. Il a permis de vérifier que les cellules étaient bien d'origine aviaire avec la présence de microchromosomes caractéristiques de cette espèce. De plus, les chromosomes observés sont représentatifs des chromosomes rencontrés dans les cellules primaires d'embryons de canard confirmant ainsi l'origine de la lignée.

## II. Propriétés.

Les cellules TDF-2A présentent notamment une sensibilité aux virus spécifiques du canard tels que l'adénovirus, le parvovirus et le reovirus qui sont habituellement répliqués sur cellules primaires d'embryons de canard. On peut donc produire ces virus sur cette lignée.

**EXEMPLE 2 : Caractérisation de la lignée TDF-2A par identification des sites d'intégration.**

L'ADN génomique des cellules TDF-2A, préparé à partir des cellules provenant du 114ième et du 135ième passages, a été digéré par les enzymes de restriction BglII et KpnI. L'ADN ainsi traité est alors soumis à une électrophorèse sur gel, suivie d'un transfert sur membrane de nylon, puis hybridé avec une sonde spécifique de l'antigène T (fragment NdeI/NdeI de 1018 pb). Ainsi, la digestion par BglII permet d'obtenir deux bandes d'hybridation de haute taille (d'environ 15 et 23 kb) suggérant l'existence de deux sites d'intégration. La digestion par KpnI entraîne l'obtention d'une bande majoritaire de haute taille (environ 20 kb) et d'au moins une bande minoritaire confirmant l'existence d'au moins deux sites d'intégration.

**EXEMPLE 3 : Production de la lignée cellulaire TCF-4.10**

**1. Description de son origine et de ses caractéristiques**

**1.1. Description du vecteur utilisé : vecteur pphMT**

Il comporte la région précocé du virus SV40 (code pour les antigènes T et t) (fragment HindIII/BamHI) (Fiers et al. (1978), Nature 273 : 113-120) sous le contrôle du promoteur métallothionéine I de souris (fragment EcoRI/BglII transformé en site HindIII) (Durnam et al. (1980), Proc. natl. Acad. Sci. USA 77 : 6511-6515 ; Brinster et al. (1982), Nature 296 : 39-42).

Le fragment EcoRI/EcoRI contenant cette unité transcriptionnelle provenant du vecteur pMTSVneo (Peden et al. (1989), Exp. Cell. Res. 185 : 60-72) a été inséré dans le site EcoRI du vecteur pUT507 (commercialisé par CAYLA-FRANCE) situé en 3' de la région permettant l'expression du gène de résistance à la phléomycine (figure 2). La structure du vecteur pUT507 est décrite dans Mulsant et al. (1988), Somatic Cell and Molecular genetics 14 : 243-252.

**1.2. Etablissement de la lignée et démonstration du caractère immortalisé.**

Des fibroblastes provenant d'embryons de poulet ont été transfectés par le vecteur pphMT par la méthode utilisant le diméthylsulfoxyde (DMSO) et décrite par Kawai et Nishizawa (1984), Mol. Cell. Biol. 4 : 1172-1174. Les cellules transfectées sont ensuite sélectionnées par application progressive (de 10 µg/ml à 50 µg/ml) de phléomycine pendant 15 jours. Les clones résistants sont alors subcultivés régulièrement à raison de 1 à 2 passages par semaine. Après une période de prolifération active d'environ 2 mois, les cellules sont entrées dans une période de crise où la croissance cellulaire est très faible et durant laquelle la mortalité est très élevée. Après une période qui a durée de 3 à 4 mois, quelques cellules du clone TCF-4.10 ont repris une prolifération active suggérant leur immortalisation.

Les cellules TCF-4.10 ont atteint ainsi 200 passages en culture soit environ 400 générations et ont été maintenues en culture pendant 3 années. Comparativement, des fibroblastes témoins, n'exprimant pas la région précoce du virus SV40 ne peuvent être maintenus en culture plus de 20 à 30 passages.

### 1.3. Caractéristiques de prolifération.

Les fibroblastes immortalisés sont cultivés à 38°C dans un milieu HAM F-10 10X à 6%, 199 HANKS 10X à 4%, Tryptose Broth Phosphate 2,95% à 4%, Bicarbonate de sodium 5,6% à 2,5%, vitamine BME 100X à 0,1%, sérum de veau foetal à 3%, Kanamycine 5% à 1%, Vancomycine 0,5% à 1%. Dans ces conditions, leur taux de doublement est de 0,7 par 24 heures.

### 2.2. Expression de l'antigène T.

Par immunofluorescence ou immunophosphatase indirectes en utilisant un anticorps spécifique de l'antigène T (Pab 101 : Santa Cruz Biotechnology ref. sc147), il a été vérifié que toutes les cellules expriment l'antigène T dans leur noyau, indiquant qu'elles ont toutes intégré le vecteur.

### 2.3. Absence de pouvoir tumorigène.

Les fibroblastes immortalisés ne présentent pas de pouvoir tumorigène. Ils sont incapables de former des tumeurs sur membrane chorioallantoïdienne d'oeufs de poule ou de cane.

### 3. Propriétés.

Les cellules TCF-4.10 présentent notamment une sensibilité aux virus aviaires. On peut citer notamment les Poxvirus aviaires tels que le Canary-pox, le

Fowl-Pox, ou encore les virus de la maladie de Marek (sérotypes 1, 2 et 3(HVT)), le virus de la maladie de Gumboro. On peut donc produire ces virus sur cette lignée.

#### **EXEMPLE 4 : Multiplication du Canary-Pox sur cellules TCF-4.10.**

5 Les cellules TCF-4.10 sontensemencées en flacon roulant. Le Canary-Pox est inoculé sur tapis établi. Lorsque l'effet cytopathique engendré par le virus est généralisé, la récolte est effectuée par agitation de façon à décoller le tapis cellulaire. Celle-ci est donc composée du tapis cellulaire et de surnageant de culture.  
10 L'ensemble est homogénéisé par un traitement ultraturrax pendant 1 mn à 13 500 tours/mn (appareil IKA type T25).

La détermination du titre viral infectieux est réalisée en microméthode sur plaque de 96 puits. Les dilutions de virus sont inoculées sur tapis établi de cellules secondaires d'embryons de poulet. Chaque dilution virale est inoculée sur 6 cupules.  
15 Les plaques sont placées en incubation dans un incubateur à CO<sub>2</sub> pendant 8 jours. La présence de virus dans les cupules est contrôlée au microscope en observant l'effet cytopathique (ECP) caractéristique. Le titre infectieux est calculé selon la méthode de KARBET et est exprimé par le logarithme de l'inverse de la dilution virale donnant 50% d'ECP [Titre =  $d+r/N \times (n+N/2)$ ] avec d égal à la dilution exprimée  
20 en log où il y a 100% de cupules positives, r égal à la raison de la dilution, N égal au nombre de cupules par dilution et n égal au nombre de cupules positives entre 0 et 100%).

Résultats : Les titres viraux obtenus sont équivalents à ceux obtenus sur cellules  
25 primaires d'embryons de canard.

#### **EXEMPLE 5 : Intégration du gène bcl-2**

Un vecteur permettant l'expression du gène bcl-2 sous le contrôle du promoteur CMV (Cytomegalovirus humain) est transfecté dans les cellules TDF-2A  
30 et TCF-4.10 en utilisant les méthodes classiques de transfection (méthode au DMSO décrite par Kawai et Nishizawa (1984), Mol. Cell. Biol. 4 : 1172-1174 ou lipofectamine suivant les recommandations du fournisseur GIBCO-BRL).

Après sélection des cellules transfectées, l'expression de la protéine Bcl-2 est détectée par western-blot.

Les cellules exprimant la protéine Bcl-2 sont alors testées pour leur capacité à survivre dans des conditions de culture où un processus d'apoptose est observé (maintien des cellules à confluence).

Ainsi, dans le cas des cellules TDF-2A bcl-2, le processus d'apoptose engendré par l'arrivée des cellules à confluence est différé de 3 à 4 jours par rapport aux cellules TDF-2A. Dans le cas des cellules TCF-4.10 bcl-2, une augmentation de la densité cellulaire à confluence est observée par rapport aux cellules TCF-4.10.

10

15

20

25

30

**REVENDEICATIONS**

1. Lignée cellulaire aviaire immortalisée mais non transformée et résistante à l'apoptose.

5 2. Lignée cellulaire aviaire selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est obtenue à partir de cellules de tissus aviaires.

3. Lignée cellulaire aviaire selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle provient de fibroblastes ou de cellules épithéliales.

10 4. Lignée cellulaire aviaire immortelle, non transformée, choisie parmi le groupe consistant en :

- lignée TDF-2A bcl-2 déposée à la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur) sous la référence I-1709.

- lignée TCF-4.10 déposée à la CNCM sous la référence I-1710

- lignée TCF-4.10 bcl-2 déposée à la CNCM sous la référence I-1711.

15 5. Cellules aviaires immortelles issues de la lignée cellulaire selon l'une des revendications 1 à 4.

6. Cellules selon la revendication 5, caractérisées en ce qu'elles contiennent au moins une cassette d'expression comprenant au moins une séquence nucléotidique codant pour une molécule d'intérêt industriel.

20 7. Cellules selon la revendication 6, caractérisées en ce que la séquence nucléotidique code pour une sous-unité virale de type peptide, protéine, glycoprotéine ou pour des molécules protéiques telles que des hormones.

25 8. Cellules selon la revendication 5, caractérisées en ce qu'elles sont infectées, de préférence chroniquement, par un virus apte à se multiplier dans ces cellules.

9. Cellules selon l'une quelconque des revendications 5 à 8, caractérisées en ce qu'elles contiennent un gène de survie ou anti-apoptose autre que bcl-2, de préférence choisi parmi le groupe consistant en p19E1B de l'adenovirus humain, LMP-1 du virus Epstein Barr, BHRF1 du virus Epstein Barr, ICP34.5 du virus herpes simplex et p35 du baculovirus.

30 10. Cellules selon l'une quelconque des revendications 5 à 9, caractérisées en ce qu'elles intègrent des vecteurs aptes à surexprimer un ou des gènes impliqués

dans le contrôle du cycle cellulaire afin d'augmenter la vitesse de prolifération.

**11.** Cellules selon l'une quelconque des revendications 5 à 10, caractérisées en ce qu'elles intègrent des gènes codant pour des récepteurs viraux.

**12.** Cellules selon l'une quelconque des revendications 5 à 11, caractérisées  
5 en ce qu'elles intègrent des oncogènes aptes à accélérer la croissance cellulaire.

**13.** Procédé de production de molécules d'intérêt industriel ou de virus, comprenant la culture de cellules selon l'une quelconque des revendications 5 à 12.

10

15

20

25

30



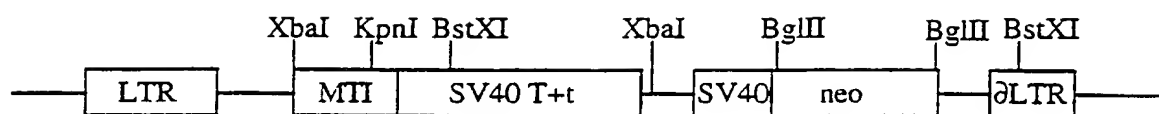
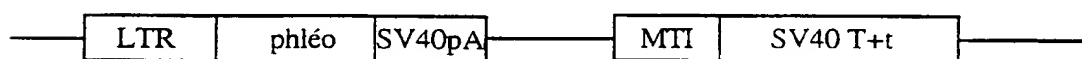
.

.

2

.



FIG. 1FIG. 2



.

.

✓

▶

Référence du dossier du  
déposant ou du mandataire BET 97/0262

Demande internationale n° PCT/FR97/00897

INDICATIONS RELATIVES A UN MICRO-ORGANISME DEPOSE

(règle 13bis du PCT)

A. Les indications ont trait au micro-organisme visé dans la description page <u>3</u> , ligne <u>16</u>	
B. IDENTIFICATION DU DEPOT <span style="float: right;">D'autres dépôts font l'objet d'une feuille supplémentaire <input type="checkbox"/></span>	
Nom de l'institution de dépôt COLLECTION NATIONALE DE CULTURES DE MICROORGANISMES (CNCM)	
Adresse de l'institution de dépôt (y compris le code postal et le pays) INSTITUT PASTEUR 28, rue du Docteur Roux F - 75724 PARIS CEDEX 15 FRANCE	
Date du dépôt 15 mai 1996	n° d'ordre I - 1709
C. INDICATIONS SUPPLEMENTAIRES (le cas échéant) <span style="float: right;">Une feuille supplémentaire est jointe pour la suite de ces renseignements <input type="checkbox"/></span>	
Il est demandé que, jusqu'à la délivrance, le rejet ou l'abandon de cette demande, l'accès au(x) microorganisme(s) visé(s) ne puisse se faire que par remise d'un échantillon à un expert n'ayant pas d'intérêt dans l'invention. Australie Notice under Regulation 3.25(3) CBE Règle 28(4) Canada Patent Rules, Section 104(4) Notice	
D. ETATS DESIGNES POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNEES (si les indications ne sont pas données pour tous les Etats désignés)	
Australie Brevet européen (CBE) Canada	
E. INDICATIONS FOURNIES SEPAREMENT (le cas échéant)	
Les indications énumérées ci-après seront fournies ultérieurement au Bureau international (spécifier la nature générale des indications p. ex., "n° d'ordre du dépôt")	

Réserve à l'office récepteur	
<input type="checkbox"/>	Cette feuille a été reçue en même temps que la demande internationale
Fonctionnaire autorisé	

Réserve au Bureau international	
<input type="checkbox"/>	Cette feuille est parvenue au Bureau international le <b>02.07.97</b>
Fonctionnaire autorisé <b>B. FITZGERALD</b>	



Référence du dossier du  
déposant ou du mandataire BET 97/0262

Demande internationale n° PCT/FR97/00897

INDICATIONS RELATIVES A UN MICRO-ORGANISME DEPOSE

(règle 13bis du PCT)

A. Les indications ont trait au micro-organisme visé dans la description page <u>3</u> , ligne <u>18</u>	
B. IDENTIFICATION DU DEPOT <span style="float: right;">D'autres dépôts font l'objet d'une feuille supplémentaire <input checked="" type="checkbox"/></span>	
Nom de l'institution de dépôt COLLECTION NATIONALE DE CULTURES DE MICROORGANISMES (CNCM)	
Adresse de l'institution de dépôt (y compris le code postal et le pays) INSTITUT PASTEUR 28, rue du Docteur Roux F - 75724 PARIS CEDEX 15 FRANCE	
Date du dépôt 15 mai 1996	n° d'ordre I - 1710
C. INDICATIONS SUPPLEMENTAIRES (le cas échéant) <span style="float: right;">Une feuille supplémentaire est jointe pour la suite de ces renseignements <input type="checkbox"/></span>	
Il est demandé que, jusqu'à la délivrance, le rejet ou l'abandon de cette demande, l'accès au(x) microorganisme(s) visé(s) ne puisse se faire que par remise d'un échantillon à un expert n'ayant pas d'intérêt dans l'invention. Australie Notice under Regulation 3.25(3) CBE Règle 28(4) Canada Patent Rules, Section 104(4) Notice	
D. ETATS DESIGNES POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNEES (si les indications ne sont pas données pour tous les Etats désignés)	
Australie Brevet européen (CBE) Canada	
E. INDICATIONS FOURNIES SEPAREMENT (le cas échéant)	
Les indications énumérées ci-après seront fournies ultérieurement au Bureau international (spécifier la nature générale des indications p. ex., "n° d'ordre du dépôt")	

Réserve à l'office récepteur	
<input type="checkbox"/>	Cette feuille a été reçue en même temps que la demande internationale
Fonctionnaire autorisé	

Réserve au Bureau international	
<input type="checkbox"/>	Cette feuille est parvenue au Bureau international le 02.07.97
Fonctionnaire autorisé B. FITZGERALD	



.

.

.

.

Référence du dossier du  
déposant ou du mandataire BET 97/0262

Demande internationale n° PCT/FR97/00897

INDICATIONS RELATIVES A UN MICRO-ORGANISME DEPOSE

(règle 13bis du PCT)

A. Les indications ont trait au micro-organisme visé dans la description page <u>3</u> , ligne <u>19</u>	
B. IDENTIFICATION DU DEPOT <span style="float: right;">D'autres dépôts font l'objet d'une feuille supplémentaire <input checked="" type="checkbox"/></span>	
Nom de l'institution de dépôt COLLECTION NATIONALE DE CULTURES DE MICROORGANISMES (CNCM)	
Adresse de l'institution de dépôt (y compris le code postal et le pays) INSTITUT PASTEUR 28, rue du Docteur Roux F - 75724 PARIS CEDEX 15 FRANCE	
Date du dépôt 15 mai 1996	n° d'ordre I - 1711
C. INDICATIONS SUPPLEMENTAIRES (le cas échéant) <span style="float: right;">Une feuille supplémentaire est jointe pour la suite de ces renseignements <input type="checkbox"/></span>	
Il est demandé que, jusqu'à la délivrance, le rejet ou l'abandon de cette demande, l'accès au(x) microorganisme(s) visé(s) ne puisse se faire que par remise d'un échantillon à un expert n'ayant pas d'intérêt dans l'invention. Australie Notice under Regulation 3.25(3) CBE Règle 28(4) Canada Patent Rules, Section 104(4) Notice	
D. ETATS DESIGNES POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNEES (si les indications ne sont pas données pour tous les Etats désignés)	
Australie Brevet européen (CBE) Canada	
E. INDICATIONS FOURNIES SEPAREMENT (le cas échéant)	
Les indications énumérées ci-après seront fournies ultérieurement au Bureau international (spécifier la nature générale des indications p. ex., "n° d'ordre du dépôt")	

Réservé à l'office récepteur
<input type="checkbox"/> Cette feuille a été reçue en même temps que la demande internationale
Fonctionnaire autorisé

Réservé au Bureau international
<input type="checkbox"/> Cette feuille est parvenue au Bureau international le <u>8 2 97 4</u>
Fonctionnaire autorisé <u>B. FITZGERALD</u>





# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/00897

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ONCOGENE, vol. 8, 1993, pages 619-624, XP002038734 GUILHOT ET AL: "THE 12S ADENOVIRAL E1A PROTEIN IMMORTALIZES AVIAN CELLS AND INTERACTS WITH THE AVIAN RB PRODUCT" cited in the application see the whole document ---	1,2,5-8, 10-13
X	WO 92 10563 A (UNIV PARIS VII) 25 June 1992 see page 1, line 3 - line 14 see page 2, line 13 - line 32 see page 5, line 14 - page 6, line 20 --- -/--	1,2,5-8, 10-13

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 August 1997

Date of mailing of the international search report

23. 09. 97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Sitch, W

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter nal Application No

PCT/FR 97/00897

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 242 272 A (AGRONOMIQUE INST NAT RECH ;CENTRE NAT RECH SCIENT (FR); UNIV CLAUD) 21 October 1987 see the whole document ---	1-3,5-8, 10-13
A	WO 91 18971 A (MOSCOVICI CARLO ;MOSCOVICI M GIOVANNELLA (US)) 12 December 1991 cited in the application see the whole document ---	1-13
A	WO 93 20200 A (IMP CANCER RES TECH ;EVAN GERARD IAN (GB)) 14 October 1993 cited in the application see page 1, line 3 - page 7, line 27 ---	1-13
A	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 7, no. 8, August 1987, pages 2794-2802, XP002038735 NEUFELD ET AL: "IMMORTALIZATION OF HUMAN FIBROBLASTS TRANSFORMED BY ORIGIN-DEFECTIVE SIMIAN VIRUS 40" cited in the application see the whole document ---	1-13
A	JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 67, no. 10, October 1993, pages 6025-6032, XP002038736 NANICHE ET AL: "HUMAN MEMBRANE COFACTOR PROTEIN (CD46) ACTS AS A CELLULAR RECEPTOR FOR MEASLES VIRUS" cited in the application see page 6025 see abstract ---	11
A	ONCOGENE, vol. 10, 1995, pages 1501-1509, XP002038737 ROSENBERG ET AL: "OVEREXPRESSION OF HUMAN CYCLIN A ADVANCES ENTRY INTO S PHASE" cited in the application see page 1501 see abstract ---	10
A	NATURE, vol. 349, 14 February 1991, pages 612-614, XP002038738 GREGORY ET AL: "ACTIVATION OF EPSTEIN-BARR VIRUS LATENT GENES PROTECTS HUMAN B CELLS FROM DEATH BY APOPTOSIS" cited in the application see page 612 see abstract -----	9

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/00897

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9210563 A	25-06-92	FR 2670215 A	12-06-92
EP 0242272 A	21-10-87	FR 2596770 A	09-10-87
WO 9118971 A	12-12-91	AU 7876191 A	31-12-91
		US 5338680 A	16-08-94
WO 9320200 A	14-10-93	EP 0633934 A	18-01-95



7

8

9

10

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den Internationale No  
PCT/FR 97/00897

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C12N5/10

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	ONCOGENE, vol. 8, 1993, pages 619-624, XP002038734 GUILHOT ET AL: "THE 12S ADENOVIRAL E1A PROTEIN IMMORTALIZES AVIAN CELLS AND INTERACTS WITH THE AVIAN RB PRODUCT" cité dans la demande voir le document en entier ---	1,2,5-8, 10-13
X	WO 92 10563 A (UNIV PARIS VII) 25 Juin 1992 voir page 1, ligne 3 - ligne 14 voir page 2, ligne 13 - ligne 32 voir page 5, ligne 14 - page 6, ligne 20 --- -/--	1,2,5-8, 10-13

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

25 Août 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

23. 09. 97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Sitch, W

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den : Internationale No  
PCT/FR 97/00897

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 242 272 A (AGRONOMIQUE INST NAT RECH ;CENTRE NAT RECH SCIENT (FR); UNIV CLAUD) 21 Octobre 1987 voir le document en entier ---	1-3,5-8, 10-13
A	WO 91 18971 A (MOSCOVICI CARLO ;MOSCOVICI M GIOVANNELLA (US)) 12 Décembre 1991 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-13
A	WO 93 20200 A (IMP CANCER RES TECH ;EVAN GERARD IAN (GB)) 14 Octobre 1993 cité dans la demande voir page 1, ligne 3 - page 7, ligne 27 ---	1-13
A	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 7, no. 8, Août 1987, pages 2794-2802, XP002038735 NEUFELD ET AL: "IMMORTALIZATION OF HUMAN FIBROBLASTS TRANSFORMED BY ORIGIN-DEFECTIVE SIMIAN VIRUS 40" cité dans la demande voir le document en entier ---	1-13
A	JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 67, no. 10, Octobre 1993, pages 6025-6032, XP002038736 NANICHE ET AL: "HUMAN MEMBRANE COFACTOR PROTEIN (CD46) ACTS AS A CELLULAR RECEPTOR FOR MEASLES VIRUS" cité dans la demande voir page 6025 voir abrégé ---	11
A	ONCOGENE, vol. 10, 1995, pages 1501-1509, XP002038737 ROSENBERG ET AL: "OVEREXPRESSION OF HUMAN CYCLIN A ADVANCES ENTRY INTO S PHASE" cité dans la demande voir page 1501 voir abrégé ---	10
A	NATURE, vol. 349, 14 Février 1991, pages 612-614, XP002038738 GREGORY ET AL: "ACTIVATION OF EPSTEIN-BARR VIRUS LATENT GENES PROTECTS HUMAN B CELLS FROM DEATH BY APOPTOSIS" cité dans la demande voir page 612 voir abrégé -----	9

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem Internationale No

PCT/FR 97/00897

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9210563 A	25-06-92	FR 2670215 A	12-06-92
EP 0242272 A	21-10-87	FR 2596770 A	09-10-87
WO 9118971 A	12-12-91	AU 7876191 A	31-12-91
		US 5338680 A	16-08-94
WO 9320200 A	14-10-93	EP 0633934 A	18-01-95

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**